Aus der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. RÖCKL

DER EINFLUSS DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION AUF DIE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STRUKTUR DER MENSCHLICHEN SPERMATOZOEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Karl-Heinz L u r z
aus Würzburg

Würzburg 1970

Aus der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. RÖCKL

DER EINFLUSS DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION AUF DIE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STRUKTUR DER MENSCHLICHEN SPERMATOZOEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Karl-Heinz L u r z
aus Würzburg

Würzburg 1970

Referent: Priv.Doz. Dr. med. Friedrich SCHRÖPL

Korreferent: Professor Dr. med. Helmut RÖCKL

Tag der Promotion:

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUFBAU DES MENSCHLICHEN SPERMIUMS 3

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 6

I. Material und Methode 6

II. Ergebnisse 9

1. Morphologische Alterationen des Kopfes 9
2. Morphologische Alterationen des Mittelstückes 14
3. Morphologische Alterationen des Schwanzes ... 19
4. Abbildungen 21

D. DISKUSSION 33

1. Mögliche Fehlerquellen 33
2. Beziehungen zwischen den pH-Verhältnissen in Vagina und Cervix und den beobachteten Veränderungen 36

E. ZUSAMMENFASSUNG 40

F. LITERATURVERZEICHNIS 41

A. EINLEITUNG

Im Jahre 1677 sah HÄM die menschlichen Spermatozoen unter dem damals erst kürzlich entdeckten Mikroskop und teilte seine Entdeckung seinem Lehrer LEUWENHOEK mit. Schon dieser, der noch ursprünglich die Entstehung der Spermien durch Urzeugung annahm, hat die Infertilität des Mannes als Folge des Fehlens von Spermien im Samen oder deren geringerer Lebenskraft angesehen. V. GLEICHEN RUSSWORM stellte im Jahre 1778 eine wesentliche Erörterung über die Infertilität des Mannes an: "Das Mikroskop könnte also bei unfruchtbaren Ehen den Streit zwischen Mann und Frau, zumal, wenn letztere zuvor in einer fruchtbaren Ehe gelebt hätte, bald entscheiden und manches Geheimnis aufdecken." Theoretisch bedeutet diese Forderung den Beginn des spermatologischen Abschnittes in der Medizingeschichte der männlichen Infertilität, wenn auch noch 1824 durch TREVIRANUS den Spermien jede Bedeutung für die Fortpflanzung abgestritten werden konnte (JOEL, 1). Zu dieser Zeit war also die Bedeutung der Spermien für die Befruchtung noch sehr umstritten. OKEN, SCHWEIGER und TREVIRANUS ordneten die Spermatozoen der Klasse der Cercarien, d.h. der niederen Würmer zu. Erst als KOELLIKER (Anatom und Physiologe in Zürich und W ü r z b u r g !) im Jahre 1841 erkannte, daß die Samenfäden in den Hodenkanälchen aus deren Zellen gebildet werden, wurde die bisherige Auffassung von der tierischen Natur der Spermien endgültig widerlegt, und es setzte sich die einheitliche Auffassung durch, daß nur durch die Spermien eine Befruchtung erzielt wird. Mit Recht sieht daher JOEL (1) KOELLIKER als ersten Vertreter einer neuen Epoche auf dem Gebiete der Spermatologie an. 1895 führte ALOIS LODE die Auszählung der Spermien im Ejakulat mit Hilfe der für die Zählung der roten Blutkörperchen angewandten Kammern ein. Die damals gefundene Durchschnittszahl von 60 Millionen im ml hat auch heute noch ihre Gültigkeit (2).

Obwohl die Forschungen durch die technischen Möglichkeiten dieses Zeitalters begrenzt waren, behielt doch ein großer Teil dieser Entdeckungen ihren Wert als Basis für immer weitreichendere

Untersuchungen. Die Diagnostik der Fertilitätsstörungen des Mannes hat sich somit in den vergangenen Jahrzehnten von den einfachsten Anfängen (Feststellung, ob überhaupt Samenfäden im Ejakulat vorhanden sind, oder nicht) zu einem in zunehmenden Maße komplizierten Verfahren entwickelt.

Erst seit Einführung der Elektronenmikroskopie war es möglich, einen genaueren Einblick in die Feinstruktur der menschlichen Spermatozoen zu bekommen. Es entwickelte sich ein neuer Zweig der Andrologie, der auch bis heute noch verhältnismäßig wenig erforscht ist:
Da die pH-Bedingungen in den unteren Genitalabschnitten der Frau einen bedeutenden Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Spermien ausüben (MILLER und KURZROCK, 35; ANTOINE, 30; VASTERLING, 19; E. LANDES, 31; BELONOSCHKIN, 28, 29; RUDOLF MEY, 32), bestand die Aufgabe und das Ziel dieser Arbeit darin, die durch bestimmte Acidität bzw. Alkalität bedingten Veränderungen an menschlichen Spermatozoen elektronenmikroskopisch zu erfassen und eventuell die Ergebnisse mit den pH-Verhältnissen in Vagina und Cervis in Beziehung zu setzen.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sei den Untersuchungen eine etwas genauere Beschreibung der Elektronenmikroskopie des normalen Spermiums vorausgeschickt.

B. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUFBAU DES MENSCHLICHEN SPERMIUMS *)

Die reifen Spermatozoen bestehen aus einem Kopf, einem Mittelstück und einem Schwanz. Die Gesamtlänge des Spermiums beträgt 55-64 μ. Der Kopf hat eine Länge von 3-5 μ, eine Breite von 2,5-3,5 μ und im sagittalen Durchmesser eine Dicke von 2-3 μ. Das Mittelstück besteht aus dem 1 μ langen Hals und aus dem 5-8 μ langen Verbindungsstück, an das sich der 46-50 μ lange Schwanz anschließt, welcher wiederum in ein Haupt- und ein Endstück unterteilt werden kann.

1. Kopf

Der Kopf der Spermien ist oval und mehr oder weniger abgeplattet, so daß er von der Kante aus betrachtet zugespitzt erscheint. Der Kern, der den ganzen Kopf ausfüllt, besteht aus dem kondensierten Chromatin. Während der Spermiohistogenese wird das Karyoplasma durch Abgabe von Flüssigkeit sehr stark konzentriert. Bei dieser Konzentrierung bilden sich kleine Kugeln, die immer näher aneinanderrücken, bis sie schließlich konfluieren (HORSTMANN, 4). Dabei entsteht vorzugsweise in der Spitze eine größere chromatinfreie Vakuole. Die Bedeutung dieser Vakuolen ist bis heute noch sehr umstritten. Der Meinung BRETTSCHNEIDERS und CHALLICES zufolge handelt es sich bei den Vakuolen um Artefakte. E. LANDES und W. KAPESSER (8) teilen diese Meinung nicht, sondern glauben vielmehr, daß diesen Vakuolen eine Bedeutung als hydrostatisches Organ zukomme, wie GATENBY und BEAMS annehmen. E. LANDES und W. KAPESSER (8) konnten in wiederholten Einbettungen immer wieder nachweisen, daß die Kernsubstanz keineswegs ein homogenes Gel ist, sondern vielmehr, daß im Spermatozoenkern eine eigentümliche, charakteristische Struktur vorhanden ist. Der von ihnen erbrachte Beweis formierter Strukturen im menschlichen Spermatozoenkern ist für die vieldiskutierte Frage, ob im ruhenden Zellkern die Chromosomen beziehungsweise die genetische Substanz als strukturierte Formation vorhanden ist, von Wichtigkeit.

---

*) In Anlehnung an (3-16).

Die stärker abgeflachte Kernspitze ist vom Akrosom überzogen. Das Akrosom entsteht in der Spermiohistogenese früh als eine Bildung des Golgikomplexes. Es ist zunächst eine Vakuole, die sich der Kernmembran im Bereich der späteren Kopfspitze anlegt und in die hinein vom Golgifeld aus Stoffe abgegeben werden (HORSTMANN, 4). Das Akrosom befindet sich in einem schmalen Spalt zwischen der Außen- und Innenmembran der Kopfkappe, die am hinteren Ende dieser Kappe ineinander übergehen und sich als Doppelmembran auf die übrigen Teile des Spermiums fortsetzen.

2. Hals

Der Kopf des Spermiums ist im Halsabschnitt, der sich an den Kopf anschließt gegenüber dem Verbindungsstück beweglich.
Im Halsabschnitt liegen die beiden Zentriolen der Samenzelle. Das kleinere proximale (noduli anteriores) liegt dicht unter der Mitte des Kernes. Es zeigt die typische Struktur eines Zentralkörperchens mit heller Innenzone, die schlauchartig von neun Filamentpaaren umgeben ist. Das andere distale Zentriol ist als Kinetosom zu bezeichnen, da aus ihm der Achsenfaden entsteht. An der Grenze von Hals- und Mittelstück soll sich nach Angabe der Lichtmikroskopie eine Querscheibe befinden. Sie läßt sich im Elektronenmikroskop nicht nachweisen. Ihre Herkunft und ihre Bedeutung ist ungeklärt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Restkörperchen des größeren distalen Zentriols, zumal man im Elektronenmikroskop an der entsprechenden Stelle bei der Spermiogenese eine Ansammlung von Zentriolenmaterial sieht (HORSTMANN, 4). Es ist sicher, daß hier der Achsenfaden beginnt, ein Fibrillensystem, das den gleichen regelmäßigen Aufbau zeigt wie die Flimmern und Geißeln überall im Tier- und Pflanzenreich: Zwei Filamente liegen in der Mitte nebeneinander und sind von einem Kranz von neun Doppelfilamenten umgeben. Die Filamente sind etwa 200 Å dick. Von den Randfilamenten ziehen speichenartige Stränge zu den Zentralfilamenten.

Der Hals enthält im Anschluß an die peripheren Doppelfilamente segmental aufeinanderfolgende bandförmige Bildungen, die mit den kräftigen Außenfibrillen des Mittelstückes und des proximalen Schwanzteiles in Verbindung stehen.

3. Mittelstück

Im Bereich des Mittelstückes wird der Filamentapparat von einer spiralig angeordneten Mitochondrienhülle umgeben. Die Anreicherung von Mitochondrien im Mittelstück kennzeichnet diesen Abschnitt des Spermiums als Zentrale der Energielieferung. Die Annahme liegt nahe, daß hier durch den intimen Kontakt des Fermentsystems mit den kontraktilen Fibrillen chemische in kinetische Energie umgewandelt wird.
Das Mittelstück endet mit einer Einstülpung der Cytoplasmamembran, die durch Material verstärkt ist, das ursprünglich zum Centriolenapparat gehörte und als Schlußring im Lichtmikroskop sichtbar ist.

4. Schwanz

Der Schwanz sorgt als Geißel durch schlängelnde Bewegung für die Fortbewegung des Spermiums. Die Beweglichkeit des Schwanzes ist auf die Kontraktilität seiner Proteinfibrillen zurückzuführen. Möglicherweise sind die neun dickeren Außenfibrillen allein die kontraktilen Elemente, während den dünneren Innenfibrillen die Aufgabe einer Erregungsleitung vom Halsabschnitt zum motorischen Apparat zufällt.

Wie schon erwähnt, wird im Schwanzteil des Spermiums ein Hauptstück und ein Endstück unterschieden:
Das kurze dünne Endstück besteht nur noch aus dem von der Zellmembran überzogenen Zentralfaden, d.h. es findet sich außer dem zentralen Fibrillenpaar nur ein konzentrischer Ring von neun dünnen Doppelfilamenten.
Das Hauptstück dagegen besitzt eine Hülle aus zirkulären Spangen, welche durch zwei längsverlaufende dicke Bänder zusammengehalten werden. Medial davon liegen, zumindest im proximalen Schwanzteil, nochmals neun viel kräftigere Fibrillen. Diese finden sich schon im Verbindungsstück. Im Schwanz laufen sie nicht alle durch das ganze Hauptstück hindurch; sie nehmen distalwärts an Dicke ab und enden in verschiedener Höhe. Ihr Verschwinden zeigt das Ende des proximalen Schwanzteiles an.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. MATERIAL UND METHODE

Das Untersuchungsmaterial umfaßte 35 Ejakulate, die von den entsprechenden Patienten aus fertilitätsdiagnostischen Gründen per masturbationem gewonnen wurden. Es wurden nur Ejakulate verwendet, deren Gesamtspermienzahl mehr als 2 Millionen betrug. Das Alter der Patienten lag zwischen 20-40 Jahren, die sexuelle Carenz betrug 2-9 Tage.

Tab. 1

Lebensalter	Zahl der Patienten mit verschiedener sexueller Carenz									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Tage
20-25 Jahre		1	1	3		2	1	2		
25-30 Jahre			1	2	3	3	1			
30-35 Jahre				2	1	1	4	2		
35-40 Jahre				1	1	1		1	1	

Vor der Präparation der Spermien wurden einige wichtige routinemäßige Bestimmungen durchgeführt: pH-Wert, Menge, Aussehen und Verflüssigungszeit des Ejakulates, Gesamtzahl der Spermien pro ml, prozentualer Anteil der beweglichen Spermien, Qualität ihrer Motilität, prozentualer Anteil der pathologischen Spermien und schließlich die Fruktose.

Die nach diesen Kriterien brauchbaren Ejakulate wurden zunächst mit Milchsäure (das saure Milieu der Vagina ist auf den starken Milchsäuregehalt zurückzuführen!) bzw. mit NaOH versetzt. Beide Lösungen mußten 0,3-molar - Sperma ist ebenso wie Blut 0,3-molar (DOCUMENTA GEIGY, 18; HEINKE und DOEPFMER, 2) - sein, damit die Isotonie gewahrt blieb. Der geforderte osmotische Druck wurde mit dem Knauer-Osmometer eingestellt. Die genaue Bestimmung des jeweils gewünschten pH des Ejakulates und der zur Präparation erforderlichen Lösungen wurde mit dem pH-Meter vollzogen.

Die weitere Aufbereitung erfolgte in folgenden Arbeitsgängen:
1.) Zentrifugieren bei 2500 Umdrehungen (1257,5 g), (10 min.)
2.) 3-maliges Auswaschen mit angesäuerter Ringerlösung; an-

schließend Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen (1006 g), (3 min.).

3.) Fixieren: Verwendet wurde eine 1%ige Lösung, bestehend aus Osmiumsäure und Veronalacetatpuffer (Mischungsverhältnis 1:1). Der Veronalacetatpuffer war deshalb gut geeignet, weil er in seinem wirksamen pH-Bereich sehr variiert werden konnte (pH 3,2-9,1). Das Fixieren dauerte 5 Minuten.

4.) Dreimaliges Auswaschen der Osmiumsäure mit angesäuerter Ringerlösung; anschließend zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen (3 min.).

5.) Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe.

6.) Zwischenkontrastierung nach WOLFAHRTH-BOTTERMANN (auf der Stufe des 70%igen Alkohols) mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure (siehe REIMER, 17).

7.) Methacrylat- oder Eponeinbettung:

a.) Die Methacrylateinbettung nach NEWMAN, BORYSKO und SWERDLOW (siehe REIMER, 17) wurde in modifizierter Form gehandhabt:

50/50 100%iger Alkohol und Methacrylat (9 Teile Butylmethacrylat und 1 Teil Methacrylat) 15 Minuten auf die Spermien einwirken lassen; anschließend zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen,(3 min.).
Methacrylatgemisch allein 15 Minuten auf die Spermien einwirken lassen; anschließend zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen (3 min.).
Methacrylat und 0,5% Initiator (Benzoylperoxyd) 15 Minuten auf die Spermien einwirken lassen; anschliessend zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen, (3 min.).
2-3 Tropfen dieser Suspension in die Gelatinekapseln füllen, zentrifugieren (3 min.), und Polymerisation im Brutschrank bei 58°C (24 Stunden).

b.) Die Eponeinbettung nach Luft (siehe REIMER, 17) wurde nur geringfügig modifiziert:

Nach Entwässerung mit 100%igem Alkohol 15 Minuten Prophylenoxyd einwirken lassen; dann abzentrifugieren bei 2000 Umdrehungen (3 min.).
1/2 Stunde 50/50 Prophylenoxyd und Epon einwirken lassen; dann abzentrifugieren bei 2500 Umdrehungen

(3 min.).
Spermien 2-mal 1/2 Stunde in reinem Epongemisch (siehe REIMER, 17) stehen lassen; dann jeweils 30 Minuten bei 3500-4000 Umdrehungen (1760,5-2012 g) zentrifugieren. Spermien nochmals 1 Stunde in reinem Epongemisch stehen lassen; anschließend 30 Minuten abzentrifugieren bei 4000 Umdrehungen (2012 g).
Einkapseln der Suspension in Gelatinekapseln, zentrifugieren 30 Minuten bei 4000 Umdrehungen; anschliessend Polymerisation bei 60°C (48 Stunden).

Das Schneiden der polymerisierten Blöcke erfolgte mit dem Fernandez-Moran-Mikrotom (3-5 Schnitte von jedem Präparat), die Schnitte wurden mit dem Zeiss-EM-9A betrachtet. Die Auswertung geschah in tabellarischer Form, d.h. für jede untersuchte pH-Stufe wurden Tabellen angelegt. In der Arbeit sind nur die wichtigsten aufgeführt. Sie enthalten aus später noch zu erwähnenden Gründen nur die prozentualen Ergebnisse der Methacrylatschnitte (nicht der Eponschnitte!).

Tab. 2: Anzahl der Methacrylat- und Eponpräparate bei den untersuchten pH-Stufen.

Einbettung	Zahl der Präparate bei den untersuchten pH-Stufen							
	9,0	8,0	7,2-7,6	6,6	5,8	5,4	4,2	3,2 pH
Methacrylat:	3	3	3	3	3	3	2	2
Epon:	1	1	2	1	1	1	1	1

II. ERGEBNISSE der ELEKTRONENOPTISCHEN UNTERSUCHUNGEN

1.) Morphologische Alterationen im Kopfbereich.

Abbildung 1 zeigt die normale Struktur eines durch pH-Einfluß nicht veränderten Spermienkopfes. Es sei an dieser Stelle gleich betont, daß sich auch bei physiologischem pH ein bestimmter, von Präparat zu Präparat etwas abweichender Prozentsatz von Spermien findet, die im Kopfbereich Veränderungen aufweisen. Bei der Untersuchung von 10 Schnitten (es wurden jeweils 1000 Spermatozoen ausgewertet) fand sich, daß hauptsächlich das Akrosom betroffen ist.

Tab. 3: Prozentuale Häufigkeit der Akrosomveränderungen bei pH 7,2-7,6 (Es wurden 1000 Spermien statistisch ausgewertet)

Präparat	Schnitt	Akrosom unverändert	Akrosom in Ablösung befindlich	Akrosom abgelöst
	1	82%	8%	10%
I	2	76%	10%	14%
	3	74%	7%	19%
	4	80%	10%	10%
II	5	69%	18%	13%
	6	73%	12%	15%
	7	81%	11%	8%
III	8	78%	9%	13%
	9	70%	16%	14%
	10	75%	14%	11%
Mittelwert:		75,8%	11,5%	12,7%

Aus der Tabelle 1 wird ersichtlich, daß im normalen Ejakulat das Akrosom nur zu 70-80% normalstrukturiert ist. Inwieweit hierbei die Präparation eine Rolle spielt, mag zunächst dahingestellt bleiben. Die Akrosommembran ist manchmal nur in Fragmenten erhalten und fehlt natürlich, wenn das Akrosom vom Kern abgelöst ist. Degenerative Veränderungen im Karyoplasma (Pyknose, stärkere Vakuolisierung) sind in den seltensten Fällen anzutreffen. Es dürfte sich wohl um stark gealterte Zellen handeln.

Im Folgenden soll nunmehr der Einfluß steigender Wasserstoffionenkonzentration auf die Spermien (als Einwirkungszeit wurde eine 3/4 Stunde festgesetzt, da Spermien im sauren Milieu der Vagina nur eine 3/4-1 Stunde (28,29,32) lebensfähig sind) besprochen und mit den oben dargestellten Befunden verglichen werden.

Die untersuchte Zwischenstufe pH 6,6 bedarf keiner gesonderten Darstellung, da hier noch keine Abweichungen von der Norm feststellbar waren.

Bis pH 6,2 stieg der Prozentsatz der veränderten Köpfe um das Doppelte. Auch hier waren die Veränderungen hauptsächlich im Bereich des Akrosoms objektivierbar.

Tab. 4: Prozentuale Häufigkeit der Akrosomveränderungen bei pH 6,2 (Es wurden 1000 Spermien statistisch ausgewertet)

Präparat	Schnitt	Akrosom unverändert	Akrosom in Ab- bzw. Auflösung befindlich	Akrosom abgelöst
	1	52%	37%	11%
I	2	44%	35%	21%
	3	56%	30%	14%
	4	58%	26%	16%
II	5	50%	35%	15%
	6	47%	36%	17%
	7	57%	24%	19%
III	8	41%	39%	20%
	9	54%	33%	13%
	10	58%	27%	15%
Mittelwert:		51,7%	32,2%	17,1%

Bemerkenswert ist die Zunahme der Zahl der in Ablösung befindlichen und oft auch schon aufgelösten Akrosome: Das Akrosom sieht in 20% der Fälle "angefressen" aus, d.h. es ist teilweise aufgelöst. Chromatinstruktur und Kernmembran waren keinen Veränderungen unterworfen. Da sich der Kopf des Spermatozoons bei diesem pH als

relativ resistent gegenüber Milchsäure erwies, darf der in Abbildung 2 dargestellte als typisch für diese Säurekonzentration bezeichnet werden.

Ganz anders stellen sich die Verhältnisse bei pH 5,4 dar. Waren bei der untersuchten Zwischenstufe pH 5,8 nur noch 38% der Akrosome (Mittelwert aus 1000 untersuchten Spermien) normalkonfiguriert, so sinkt dieser Prozentsatz bei pH 5,4 auf etwa 10% (Mittelwert aus 1000 untersuchten Spermien). Die ganz überwiegende Mehrzahl der Akrosome (70-80%) ist mehr oder weniger zerstört. Es finden sich fließende Übergänge von Akrosomen, die trotz einer beginnenden Lysis in ihrer strukturellen Gesamtheit noch wahrzunehmen sind, zu solchen, die nur noch in Resten vorhanden sind. Eine totale Zerstörung des Akrosoms und seiner Membranen scheint diese Milchsäurekonzentration jedoch nicht zu bewirken, da der Prozentsatz der Spermienköpfe ohne Akrosom, respektive völlig abgelösten Akrosome, verglichen mit dem bei physiologischem pH, praktisch konstant geblieben ist (etwa 15%). Die Chromatinstruktur und die Kernmembran sind unverändert, während die äußere Akrosommembran oft vom Kopf weit abgehoben und an manchen Stellen eingerissen ist (20%) (siehe Abbildung 3).

Bei noch stärkerer Wasserstoffionenkonzentration (pH 4,2) sind die Auflösungsvorgänge noch ausgeprägter: Es finden sich häufiger "nackte" Köpfe (35-40%), die nur von der Kernmembran umgeben sind. Ob das Akrosom von vornherein gefehlt hat, oder ob es durch die Milchsäure aufgelöst ist, ist nicht immer mit Sicherheit festzustellen. In den übrigen 60-65 % der Fälle war das Akrosom immer völlig aufgelöst, wobei aber dessen Außenmembran noch ganz oder teilweise erhalten war. Sie zeigte zu 35-40% ähnliche Erscheinungen wie bei pH 5,4: Der Abstand zwischen Akrosommembran und Kern ist manchmal noch größer geworden. Die Akrosommembran selbst ist meistens aufgerissen (siehe Abbildung 4). Merkwürdigerweise wurden an der Kernmembran und am Chromatin immer noch keine Veränderungen beobachtet. Selbst bei pH 3,2 war der Kern nur zum geringen Teil (20-25%) der Zerstörung anheimgefallen. Die Akrosommembran war zu etwa 40%, wenn auch immer vom Kern abgehoben, deutlich wahrzunehmen; im übrigen zeigte sie das Bild der verschiedenen Zerstörungsgrade (60%).

Im alkalischen Bereich waren bei pH 8,0 nur geringfügige Unterschiede gegenüber dem Normalen festzustellen. Bei pH 9,0 jedoch verschob sich das Verhältnis von unveränderten Akrosomen zu Gunsten der veränderten.

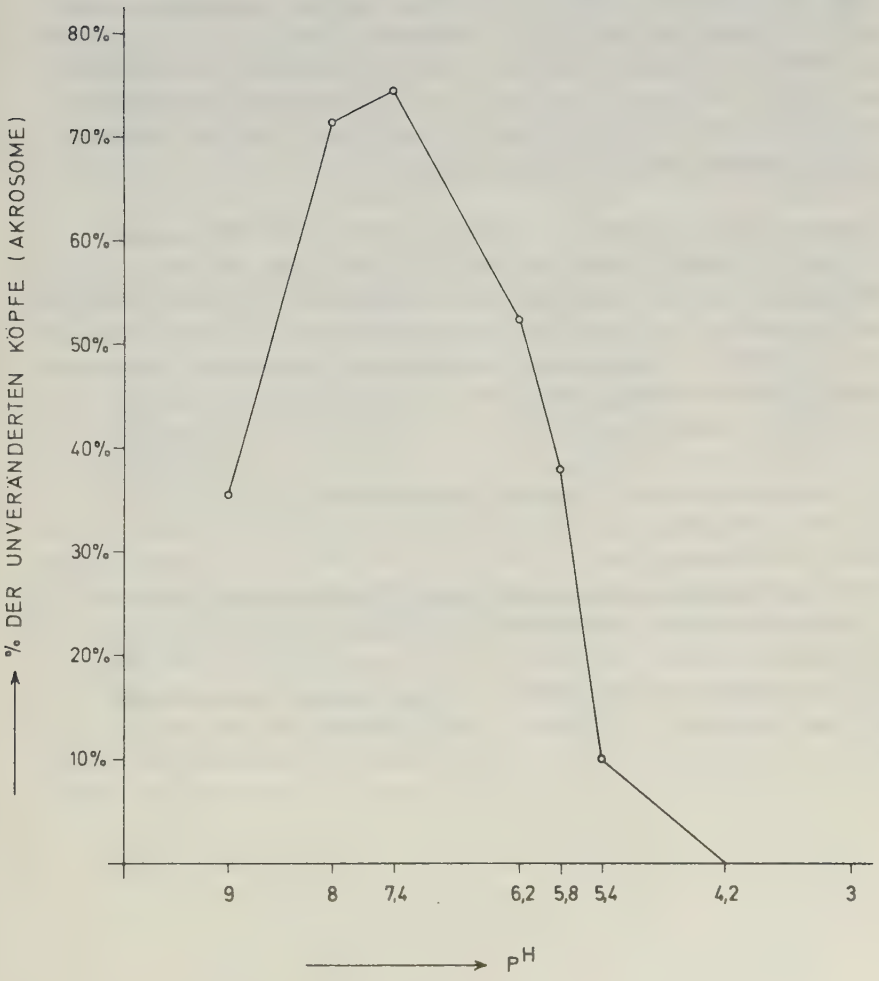
Tab. 5: Prozentuale Häufigkeit der Akrosomenveränderungen bei pH 9,0 (Es wurden 1000 Spermien statistisch ausgewertet)

Präparat	Schnitt	Akrosom unverändert	Akrosom in Auflösung begriffen	Akrosom abgelöst
	1	37%	51%	12%
I	2	36%	46%	18%
	3	30%	61%	9%
	4	34%	51%	15%
II	5	39%	48%	13%
	6	28%	50%	22%
	7	35%	52%	13%
III	8	41%	49%	10%
	9	43%	38%	19%
	10	35%	47%	18%
Mittelwert:		35,8%	49,3%	14,9%

Nur ein Drittel der Akrosome ist als normal zu bezeichnen. Der Prozentsatz der abgelösten Akrosome ist wie im pH-Bereich 7-4 konstant geblieben. Für 50% der Akrosome gilt: Das Akrosom ist blasig aufgetrieben und größtenteils zerstört (siehe Abbildung 5), seine Membran zu 20% aufgerissen. Chromatin und Kernmembran hatten eine dem Normalen entsprechende Struktur.

Fig. 1

PROZENTUALE HÄUFIGKEIT DER VERÄNDERUNGEN DES SPERMATOZOONKOPFES (AKROSOMS) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION.



2.) Morphologische Alterationen im Bereich des Mittelstückes.

Bei dieser Darstellung soll das Augenmerk besonders auf die für die Spermienmotilität als Energielieferanten so wichtigen Mitochondrien gerichtet werden.

Ähnlich wie beim Akrosom sind auch hier zwischen pH 7,2-7,6, also physiologischen pH-Verhältnissen, etwa 30% (Mittelwert aus 1000 untersuchten Spermien) der Mittelstücke - zumindest was die Mitochondrien betrifft - verändert. Häufig liegt statt der geordneten Leistenstruktur eine mehr grobkörnige Granulierung vor (20%). In manchen Fällen ist die Doppelmembran der Mitochondrien ebenso wie die dünne Zellmembran, die den schmalen Cytoplasmasaum umgibt, aufgerissen.

Schon bei pH 6,6 ist ein deutlicher Einfluß des Milchsäuremilieus zu sehen. Natürlich kann dies wiederum nur durch die Gegenüberstellung der prozentualen Häufigkeit von unveränderten zu veränderten Mittelstücken eruiert werden, da - wie schon betont - auch bei normalen pH-Verhältnissen keineswegs alle Mitochondrien unbeschädigt sind. Sie kommen bei pH 6,6 in drei verschiedenen Formen vor:

1.) Mitochondrien mit intakter Doppelmembran und gut sichtbaren Leisten.

2.) Mitochondrien mit intakter äußerer Membran und aufgelösten Leisten (Innenstruktur granuliert!).

3.) Mitochondriendoppelmembran aufgerissen mit Zerstörung der Leisten.

Tab. 6: Prozentuale Häufigkeitsverteilung verschiedener Mitochondrienstrukturen bei pH 6,6.
(Es wurden 1000 Spermien statistisch ausgewertet)

Präparat	Schnitt	Mitochondrien intakt mit gut ausgebildeten Leisten	Mitochondrien mit intakter äußerer Membran und granulierter Innenstruktur	Mitochondrien-doppelmembran aufgerissen, Leisten zerstört
	1	47%	45%	8%
I	2	38%	52%	10%
	3	43%	36%	21%
	4	42%	49%	9%
II	5	50%	43%	7%
	6	46%	45%	9%
	7	37%	42%	21%
III	8	39%	48%	13%
	9	42%	41%	17%
	10	40%	39%	21%
Mittelwert:		42,4%	44,0%	13,6%

Bei geringer Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration (pH 6,2) beherrschen die veränderten Mittelstücke weitgehendst das dargebotene Bild. Nur bei 25-30% der Mittelstücke sind Mitochondrien mit deutlich ausgeprägten Leisten vorhanden (siehe Abbildung 6). Viel häufiger (55-65%) hat sich die geordnete Leistenstruktur in eine grobkörnige Granulierung verwandelt (siehe Abbildung 7). Da die Leisten von der inneren Membran ausgehen, ist diese fast immer in den Auflösungsprozeß miteinbezogen. Eine Zerstörung der Außenmembran ist seltener festzustellen (10-15%).

Tab. 7: Prozentuale Häufigkeitsverteilung verschiedener Mitochondrienstrukturen bei pH 6,2.
(Es wurden 1000 Spermien statistisch ausgewertet)

Präparat	Schnitt	Mitochondrien intakt mit gut ausgebildeten Leisten	Mitochondrien mit intakter äußerer Membran und granulierter Innenstruktur	Mitochondriendoppelmembran aufgerissen, Leisten zerstört
	1	25%	60%	15%
I	2	26%	65%	9%
	3	28%	57%	15%
	4	28%	54%	18%
II	5	30%	60%	10%
	6	22%	59%	19%
	7	32%	55%	13%
III	8	25%	60%	15%
	9	27%	55%	18%
	10	32%	54%	14%
Mittelwert:		27,5%	57,9%	14,6%

Der Prozentsatz der aufgerissenen Mitochondrien (vergleiche Tab. 6 und 7) bleibt sowohl bei pH 5,8 als auch bei pH 5,4 nahezu unverändert. Erheblich zugenommen hat bei letzterem pH-Wert die Zahl der Mittelstücke, deren Mitochondrien mannigfaltige Formen der Auflösung ihrer geordneten Struktur erkennen lassen (80-85%). Einerseits sind die Leisten zusammen mit dem inneren Teil der Doppelmembran verklumpt (siehe Abbildung 8), andererseits sind sie wie bei pH 6,2 grobkörnig aufgelöst. Auf den untersuchten Schnitten (es wurden 1000 Spermien ausgewertet) fanden sich 0-5% Mitochondrien mit einigen wenigen Leisten pro Mitochondrium - bei pH 5,8 waren es immerhin noch etwa 15% -. Die Cytoplasmamembran war meistens aufgerissen oder schon völlig aufgelöst.

In gleicher Weise waren bei pH 4,2 nur noch wenige Reste der sich

auflösenden Cytoplasmamembran zu sehen (siehe Abbildung 9). Die Verklumpung bzw. grobkörnige Granulation der Mitochondrien hat sich in eine feinkörnige Granulierung verwandelt. Sehr oft ist nur noch aufgelöstes Material zu erkennen (siehe Abbildung 9). Jetzt ist auch eine definitive Aussage über Veränderungen am Filamentapparat des Mittelstückes zu machen: Die Zentralfibrille und dünnen inneren Fibrillen (2x9) sind aufgelöst, die dicken äußeren Längsfibrillen immer noch unverändert (siehe Abbildung 9).

Noch eindeutiger stellen sich die Befunde bei pH 3,2 dar: Etwa 50% der Mitochondrien sind aufgeplatzt und erscheinen optisch leer (siehe Abbildung 10), die anderen noch feiner als bei pH 4,2, fast staubartig granuliert. Abbildung 10 zeigt, daß von der Zentralfibrille und den inneren Fibrillen nur ein kleines "Häufchen Staub" übriggeblieben ist, wobei die äußeren Fibrillen nach wie vor in fast allen Fällen unverändert sind.
Auch beim Alkalisieren mit NaOH erwies sich das Mittelstück als der empfindlichste Abschnitt des menschlichen Spermiums.

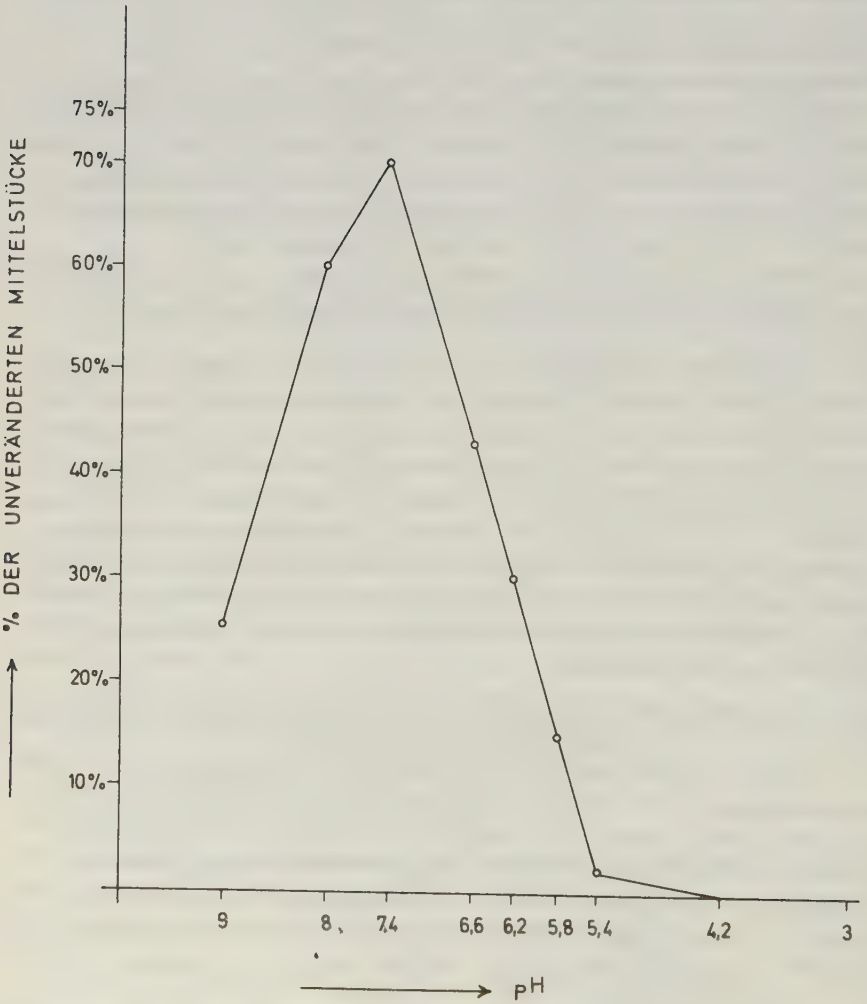
Erwartungsgemäß veränderte sich bei pH 8,0 die Anzahl der unbeschädigten Mittelstücke wenig. Sie lag durchschnittlich um 10% niedriger als bei pH 7,2. Anders bei pH 9,0: Eine Innenstruktur mit gut ausgebildeten Leisten fand sich nur bei 20-25% der untersuchten Mitochondrien. Die anderen zeigten niemals Verklumpung, aber oft Übergänge von grober in feinkörnige Granulierung (siehe Abbildung 11). Die Tatsache jedoch, daß hierbei meistens beide Teile der Doppelmembran intakt waren, spricht dafür, daß die Mitochondrien im alkalischen Milieu weniger geschädigt werden (siehe Abbildung 11).

Tab. 8: Prozentuale Häufigkeitsverteilung verschiedener Mitochondrienstrukturen bei pH 9,0
(Es wurden 1000 Spermien statistisch ausgewertet)

Mitochondrien intakt mit gut ausgebildeten Leisten	Mitochondrien-doppelmembran intakt, Innenstruktur granuliert	Mitochondrien-außenmembran intakt, Innenmembran und Leisten zerstört	Mitochondrien-doppelmembran aufgerissen, Leisten zerstört
20-25%	50-55%	10-15%	10-15%

Fig. 2

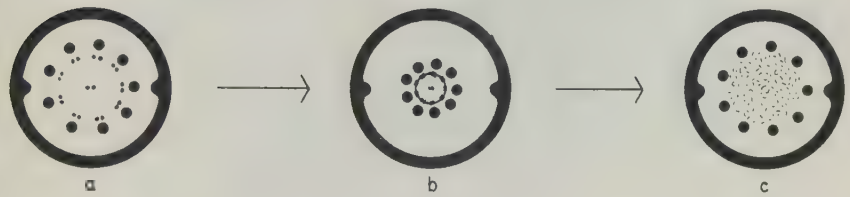
PROZENTUALE HÄUFIGKEIT DER VERÄNDERUNGEN DES MITTELSTÜCKES (MITOCHONDRIEN) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION.



3.) Morphologische Alterationen des Schwanzes.

Wurden die Zentralfibrillen und die dünnen inneren Ringfibrillen erst bei pH 4,2 aufgelöst, während die dicken äußeren Längsfibrillen intakt blieben, so kann das Gleiche über den Filamentapparat des Schwanzes gesagt werden. Allerdings entzog sich den Beobachtungen bezüglich des Mittelstückes eine an den Schwänzen schon bei pH 5,4 erfolgte Veränderung des Fibrillensystems (80-90%):

Z e i c h n u n g :



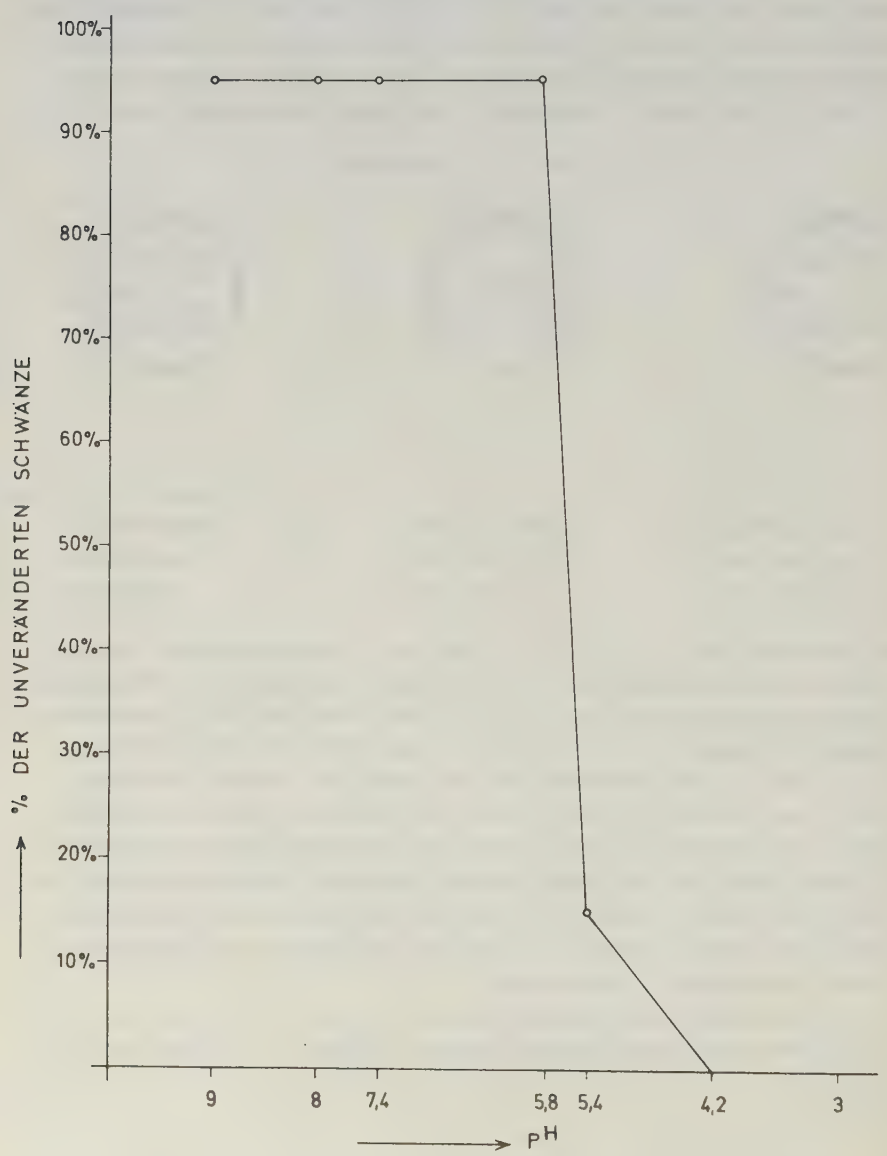
pH 7,2 und 6,2	pH 5,4	pH 4,2
Querschnitt durch das Hauptstück	Querschnitt durch das Hauptstück	vergleichende Abbildung 12 Querschnitt durch das Hauptstück

Die Zentralfibrille ist nicht mehr als "Doppelröhrchen" wahrzunehmen. Außerdem konfluieren die dünnen inneren Fibrillen (2x9) zu einem fast homogenen Ring, um sich der Zentralfibrille zu nähern. Ebenso verlagern sich die dicken Längsfibrillen etwas mehr zur Mitte. Sie bilden zusammen mit dem Ring der inneren Fibrillen eine rosettenartige Figur (siehe Zeichnung b). Der Abstand zwischen den dicken Längsfibrillen und den ganz außen liegenden circulären Fibrillen ist somit größer geworden (siehe Zeichnung b). Nach Auflösung der dünnen Fibrillen (pH 4,2) rücken die dicken Fibrillen wieder etwas weiter an die Peripherie des Schwanzes (siehe Zeichnung c, Abbildung 12).

Im untersuchten alkalischen Bereich zeigten sich keine Veränderungen.

Fig. 3

PROZENTUALE HÄUFIGKEIT DER VERÄNDERUNGEN DES SPERMIENSCHWANZES IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION.



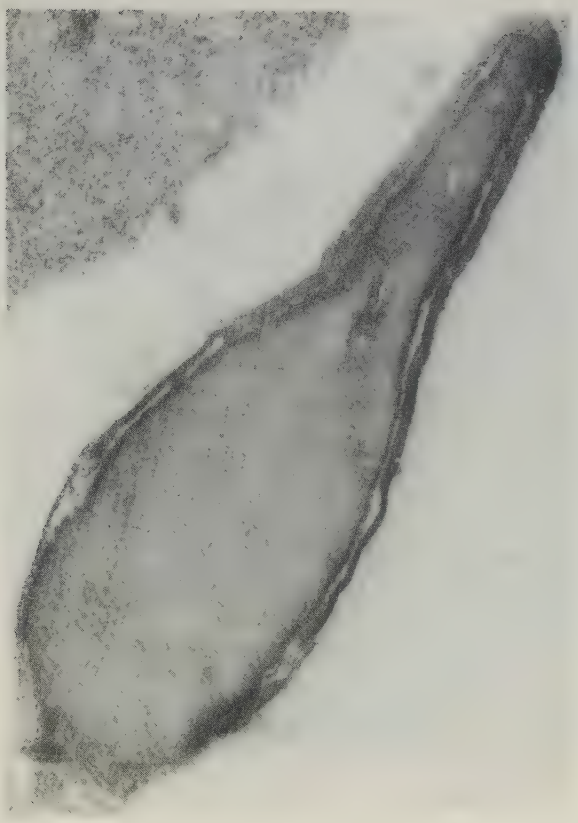


Abb. 1: Längsschnitt durch den Spermatozoenkopf bei pH 7,2.

Kopf mit dichtem kondensiertem Karyoplasma und gut ausgeprägtem Akrosom. Zu beachten sind im linken unteren Bildabschnitt die am Halsansatz zu einer Platte verdickte doppeltkonfigurierte Kernmembran und das Centriol. Vergrößerung 44200.

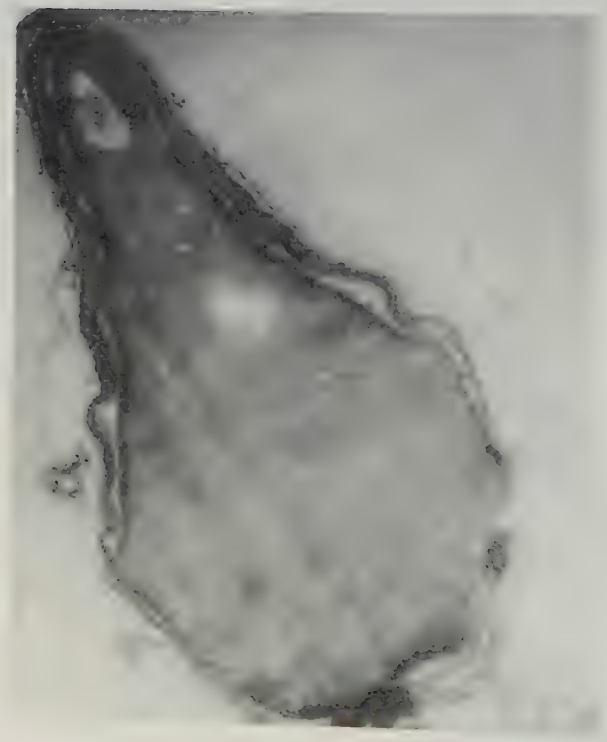


Abb. 2: Längsschnitt durch den Spermatozoenkopf bei pH 6,2.

Kernsubstanz kompakt mit zwei größeren Vakuolen, Akrosom gut erhalten. Die Akrosommembran ist fragmentiert und an einer Stelle etwas vom Akrosom abgehoben. Es handelt sich hierbei nach ZAMBONI und STEFANINI (15) um Artefakte. Vergrößerung 55600.

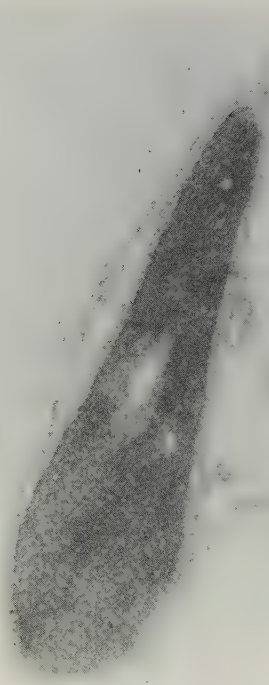


Abb. 3: Längsschnitt durch den Spermatozoenkopf bei pH 5,4.

Das Akrosom ist nur noch in Form vakuoliger Reste vorhanden. Die Akrosommembran ist an einer Stelle aufgerissen und beginnt sich vom Kern abzulösen. Vergrößerung 41800.

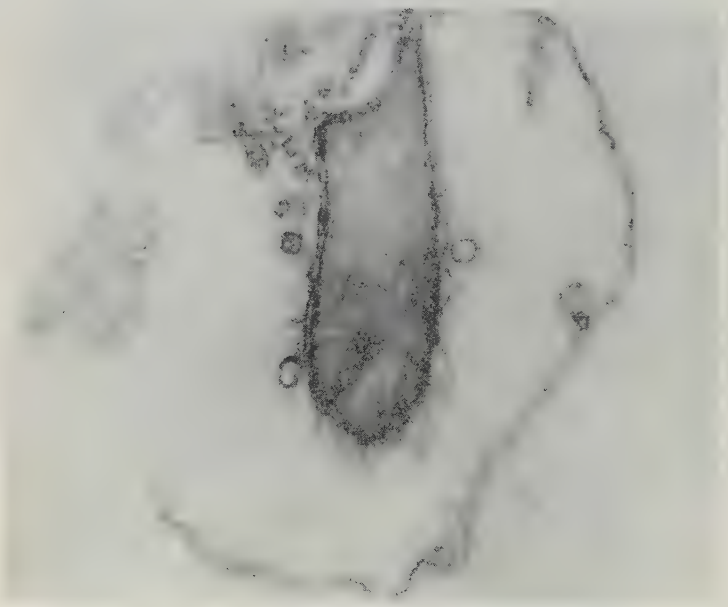


Abb. 4: Längsschnitt durch den Spermatozoenkopf bei pH 4,2.

Karyoplasma kompakt, Kerndoppelmembran deutlich sichtbar. Das Akrosom ist bis auf vakuolige Reste zerstört, die Akrosommembran ist weit vom Kern abgelöst und weitgehend zerstört. Vergrößerung 53000.

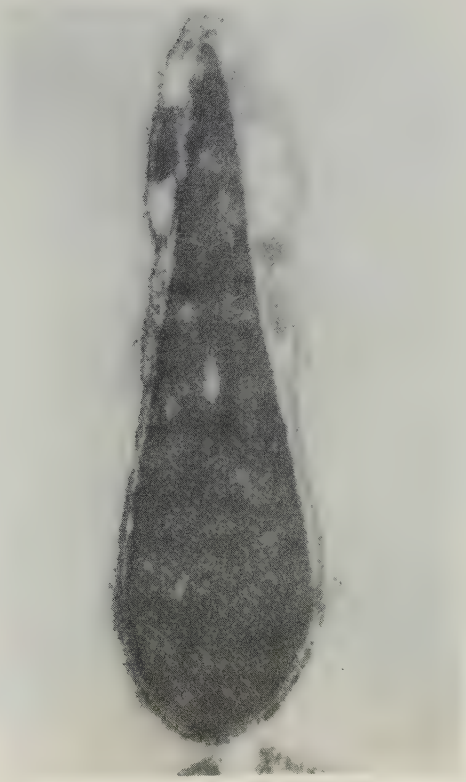


Abb. 5: Längsschnitt durch den Spermatozoenkopf bei pH 9,0.
Akrosom größtenteils zerstört, Akrosommembran erhalten, aber in Ablösung begriffen. Karyoplasma kompakt mit vielen kleinen Vakuolen. Vergrößerung 32400.

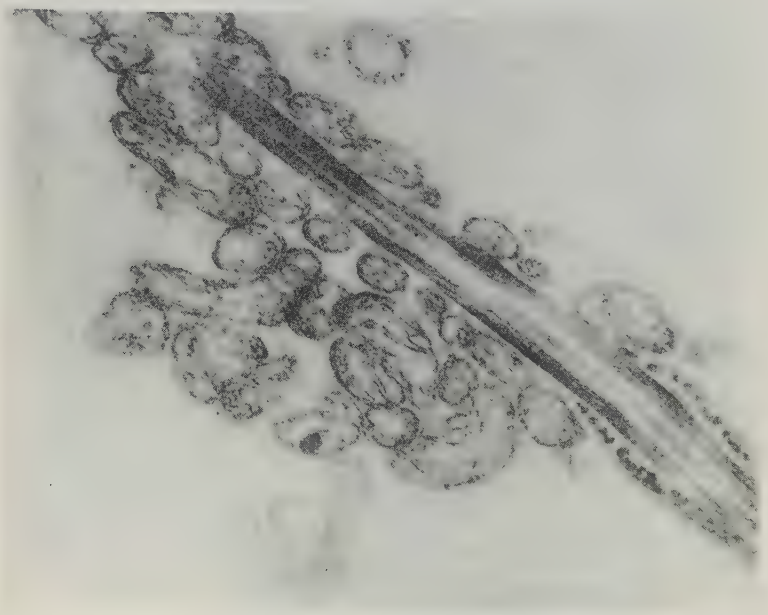


Abb. 6: Längsschnitt durch das Mittelstück bei pH 6,2.

Die meisten Mitochondrien enthalten Leisten. Am ebenfalls abgebildeten Hauptstück des Schwanzes ist von innen nach außen zu erkennen: Zentralfibrille (Doppelröhrchen), dünne innere Fibrillen, dicke äußere Längsfibrillen und schließlich ganz außen die sog. Spangenfasern im Querschnitt. Vergrößerung 56500.

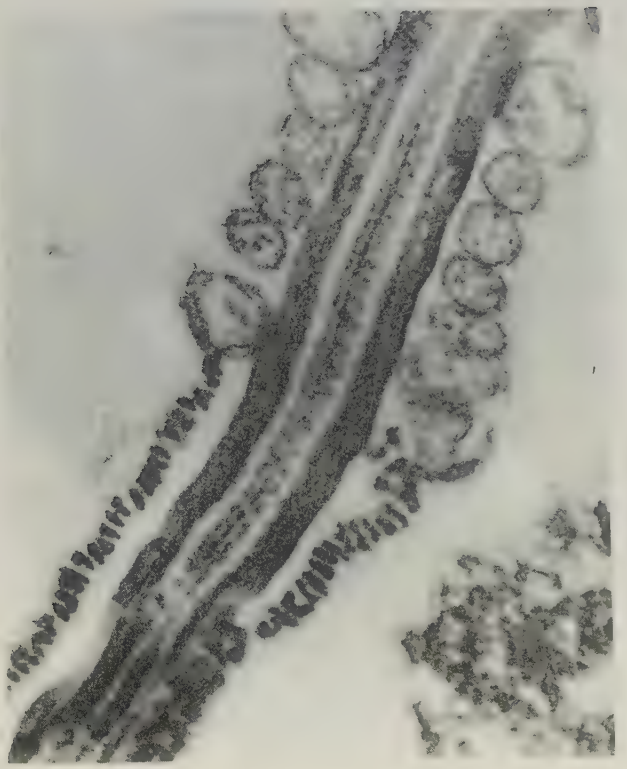


Abb. 7: Längsschnitt durch das Mittelstück bei pH 6,2.

In den Mitochondrien grobkörnige Granulierung (Auflösung der Leisten), außerdem ist die Membran nicht mehr doppeltkonfiguriert (Auflösung der inneren Membran). Das Fibrillensystem des Mittelstückes und des proximalen Schwanzteiles ist in seiner typischen Anordnung erkennbar. Die den Hauptteil des Schwanzes einhüllenden zirkulären Spangen sind tangential angeschnitten. Vergrößerung 80000.

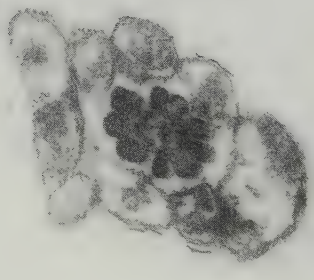


Abb. 8: Querschnitt durch das Mittelstück bei pH 5,4.

In den Mitochondrien finden sich klumpenförmige Gebilde. Die innere Membran scheint in die Verklumpung der Leisten miteinbezogen zu sein. Das Fibrillensystem zeigt die typische Anordnung. Vergrößerung 63000.

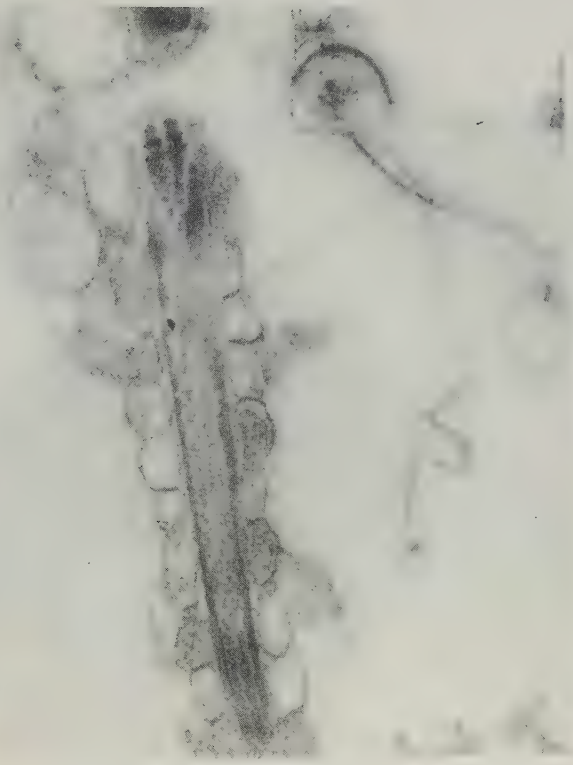


Abb. 9: Längsschnitt durch das Mittelstück bei pH 4,2

In den Mitochondrien feinkörnige Granulation, einige Mitochondrien sind aufgeblasen und sind fast schon optisch leer. Die Cytoplasmamembran ist abgelöst und größtenteils zerstört. Die dünnen Fibrillen sind aufgelöst (grob bis feinkörnige Granulation), die dicken äußeren noch intakt. Vergrößerung 55000.

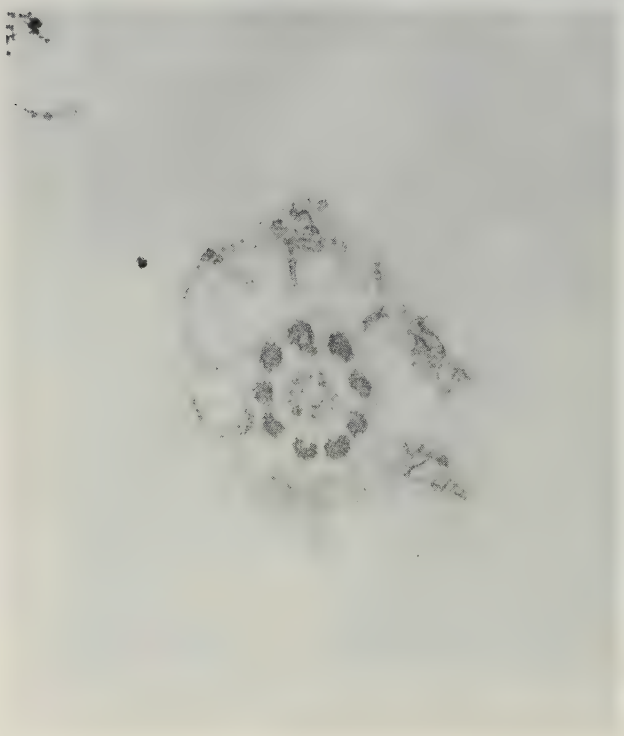


Abb. 10: Querschnitt durch das Mittelstück bei pH 3,2.

Die Mitochondrien erscheinen optisch leer, zum Teil sind sie aufgeplatzt. Die dünnen Fibrillen sind aufgelöst, die dicken noch intakt. Vergrößerung 56000.

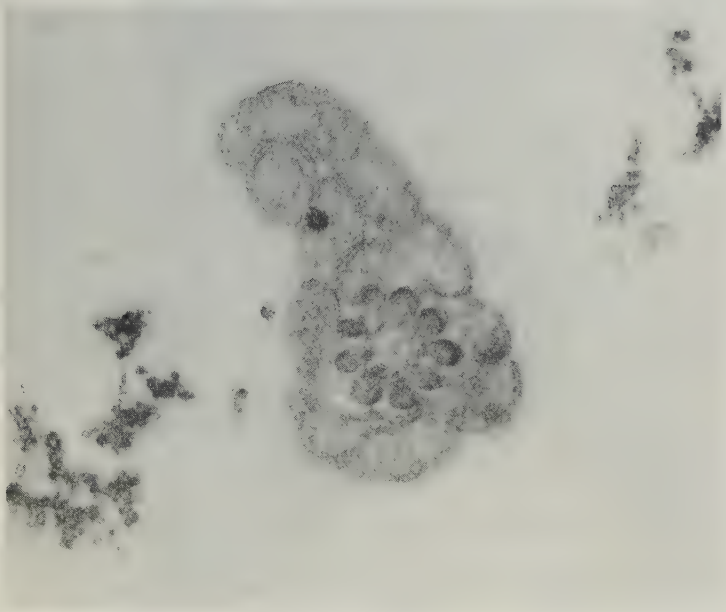


Abb. 11: Querschnitt durch das Mittelstück bei pH 9,0.

Fast immer ist die Doppelmembran der Mitochondrien zu erkennen. Leisten sind nur vereinzelt vorhanden. Das Fibrillensystem zeigt den typischen Aufbau.
Vergrößerung 51000.

Abb. 12: Querschnitt durch das Hauptstück des Schwanzes bei pH 4,2.

Die dünnen Fibrillen sind aufgelöst, die dicken äußeren noch intakt. Die Spangenfasern sind ebenfalls noch weitgehend erhalten. Die dünne Cytoplasmamembran ist in Ablösung begriffen. Vergrößerung 71000.

D. DISKUSSION

1. Mögliche Fehlerquellen

Auf mögliche Fehlerquellen bei der Beurteilung elektromikroskopischer Spermatozoonstrukturen haben ZAMBONI und STEFANINI (15) in ihrer erst jüngst veröffentlichten Arbeit "ON THE CONFIGURATION OF THE PLASMA MEMBRANE OF THE MATURE SPERMATOZOON" hingewiesen: "Swelling, fragmentation, and detachment of the periacrosomal portion of the cell membrane appear to be a constant feature of epididymal spermatozoa fixed by immersion in OsO_4 or glutaraldehyde". Diese Behauptung, die bestätigt werden konnte (es wurde ebenfalls zum Fixieren OsO_4 verwendet; siehe Methode), war jedoch für die Erkennung der pH-bedingten Veränderungen von nicht allzu großer Bedeutung.

Viel eklatanter war die zunächst irreführende Diskrepanz der Ergebnisse, wenn man die Einbettmethoden miteinander verglich. Die Auswertung der Methacrylat- und Eponschnitte erfolgte im Verhältnis 3:1 bzw. 2:1. Auf die Besprechung der Eponschnitte wurde bislang verzichtet, da der Prozentsatz der offensichtlich durch die Präparation geschädigten Spermien unverhältnismäßig groß war.

Tab. 9: Gegenüberstellung von Methacrylat- und Eponschnitten bei 7,2-7,6

(Es wurden 1000 Spermien bei Methacrylat (3 Präparate) und 600 Spermien bei Epon (2 Präparate) ausgewertet).

Einbettung:	Köpfe (Akrosom) defekt	Mittelstücke (Mitochondrien) defekt
Methacrylat:	25% (Mittelwert)	30% (Mittelwert)
Epon:	40% (Mittelwert)	50% (Mittelwert)

Eine Sedimentation der Spermien aus dem zähen Epon (dessen Eigenschaft es war, etwas "feiner zu zeichnen") konnte nur durch schnelleres (3500-4000 Umdrehungen pro Minute = 1760,5-2012 g!) und längeres Zentrifugieren (siehe Methode) erreicht werden. Daß hierbei das Akrosom und vor allem die empfindlichen Mitochondrien in Mitleidenschaft gezogen wurden, ist verständlich.

Ob bei der Methacrylateinbettung präparationsbedingte Schäden auszuschließen sind, ist nicht mit Sicherheit zu beantworten. Immerhin kann gesagt werden, daß sich die Methacrylateinbettung als sehr brauchbar erwies. Dafür sprechen auch Vergleiche mit lichtmikroskopischen Befunden: Es ist schon seit langem bekannt, daß eine 5%ige, wässrige Eosinlösung die Zellmembran toter oder absterbender bzw. geschädigter Spermien zu durchdringen vermag, während lebende bzw. unbeschädigte Spermien diesen Farbstoff nicht annehmen (HEINKE und DOEPFMER, 2; 21, 22, 27). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen (Methode nach HEINKE, 2) waren beispielsweise bei physiologischem pH 2 Stunden post Ejakulationem durchschnittlich 30% (Mittelwert aus 4 Ejakulaten) der Spermien rot gefärbt. (siehe Figur 4). Auch bei pH-Verschiebung ähneln sich die Figuren 1 und 2 einerseits und die Figur 4 andererseits stark in ihrem Verlauf. Es ergibt sich somit eine auffallende Korrelation von licht- zu elektronenmikroskopischen Ergebnissen. Daraus könnte man entnehmen, daß die präparationsbedingten Schäden - was die Methacrylateinbettung betrifft - relativ gering sind.

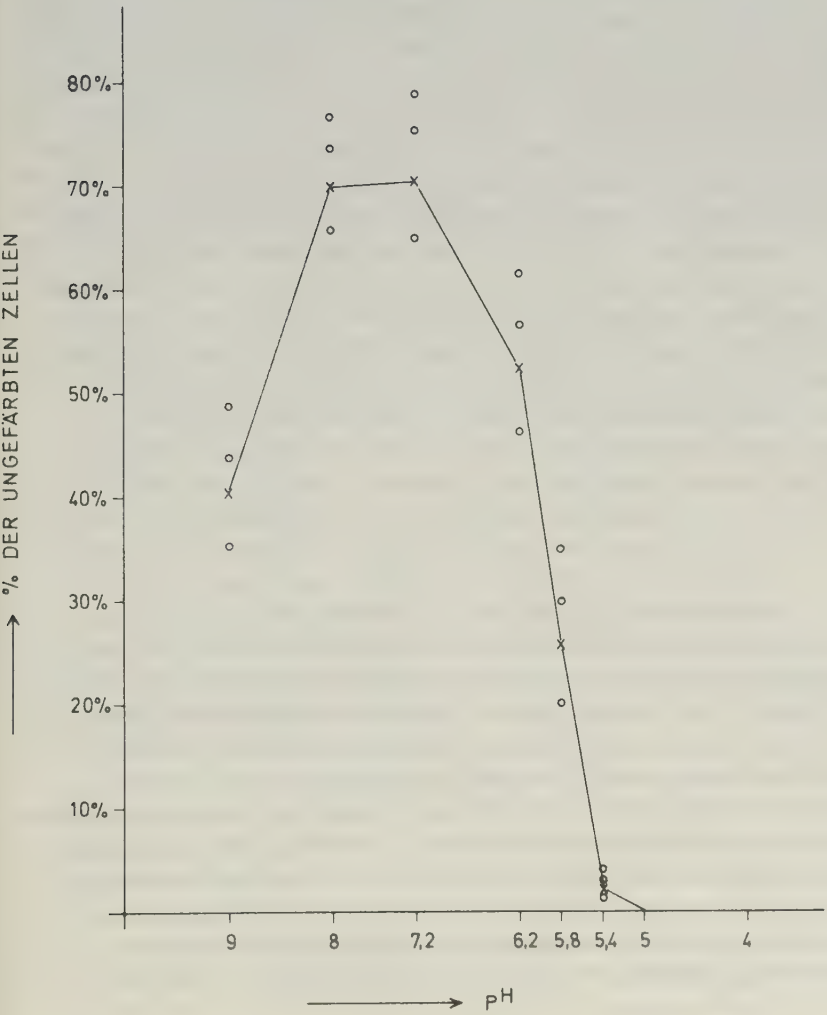
Bakterien und deren Toxine verursachten sicherlich keine Verfälschung der Ergebnisse, da sie in den höchstens 2 Stunden alten Ejakulaten in verschwindend geringer Zahl vorhanden waren.

In welchem Maße bei der Auswertung der Präparate "subjektive Fehlerquellen" mitspielen, mag durch folgendes Beispiel erklärt werden: Bei physiologischem pH (pH 7,2) fanden sich 12% Köpfe ohne Akrosomen. Die im basalen Drittel angeschnittenen Köpfe erschienen ihrem Aufbau entsprechend akrosomlos. Trotz der Bemühung, derartig angeschnittene Köpfe nicht in die Auswertungen einzubeziehen, könnte ein geringer Teil fälschlicherweise in der Kategorie "Akrosom abgelöst" aufgeführt sein. Es würde sich dabei aber nur um eine geringe Fehlerbreite handeln.

Fig. 4

EOSINTEST: PROZENTUALE HÄUFIGKEIT DER UNGEFÄRBTEN (VITALEN) ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH

3/4 STUNDE VERWEILDAUER IN MILCHSÄURE BZW. NATRONLAUGE.



2.) Beziehungen zwischen den pH-Verhältnissen in Vagina und Cervix und den beobachteten Veränderungen

Wenn im Verlaufe dieser Erörterung der Versuch unternommen wird, die "in vitro" gewonnenen Kenntnisse auf die Verhältnisse "in vivo" zu projezieren, kann dies nicht ganz vorbehaltlos geschehen:

Bei der Kohabitation werden etwa 3-5 ml alkalischen Ejakulates in die Vagina gebracht. Das alkalische Sperma, das in die Vagina eindringende alkalische Cervixsekret und die Absonderungen der Bartholinischen Drüsen führen eine Verminderung des Aciditätsgrades des Vaginalinhaltes herbei. Sind keine pathologischen Keime vorhanden, so verschiebt sich der pH-Wert im hinteren Drittel der Vagina nach stattgefundener Kohabitation von etwa 4,2 auf 6,2, um aber bereits nach 2 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückzukehren. (VASTERLING, 19). Diese Sicherheitsmaßnahme der Natur bietet somit den Spermien nicht lange Schutz. Nach Untersuchungen von BELONOSCHKIN (28, 29) und JOEL (1) können Spermien in der Vagina nur 45-60 Minuten überleben. Daß hierfür noch andere schädigende Faktoren als die reine Wasserstoffionenkonzentration entscheidend sind, beweisen Motilität, Vitalität und nicht zuletzt die elektronenoptische Struktur der Spermien bei einem pH-Wert, der dem des Vaginalinhaltes post Kohabitationem entspricht(pH 6,2): 50% der Köpfe und 25-30% der Mittelstücke sind noch völlig unversehrt. An den Schwänzen sind noch keinerlei Veränderungen festzustellen. Etwaige Motilitätsverluste dürften daher auf die Zerstörung der Mittelstücke (Mitochondrien) zurückzuführen sein. Der Prozentsatz der beweglichen Spermien beträgt bei diesem pH-Wert nach einer Verweildauer von einer Stunde in Milchsäure etwa 45% (VASTERLING, 20 und eigene orientierende Untersuchungen). Entweder ist also ein Teil der Spermien trotz Aufhebung der geordneten Leistenstruktur der Mittelstücke beweglich, oder es ist unter Umständen so, daß durch das Zentrifugieren der durch Säurewirkung sozusagen vorgeschädigten und in ihrer Struktur fragileren Mitochondrien erst das endgültige Bild der grobkörnigen Granulierung zustande kommt. In diesem Zusammenhang muß auf die Schwierigkeit, pH- und präparationsbedingte Veränderungen zu unterscheiden, hingewiesen werden. Möglicherweise verstärken sich beide gegenseitig.

Bei ihrer weiteren Ascension benutzen die Spermien gewissermaßen als Leitstraße den kaskadenartig in die Scheide hineinragenden Schleim des Gebärmutterhalses, der besonders zur Zeit der Ovulation den Spermien ein sehr günstiges Milieu hinsichtlich seiner chemischen Beschaffenheit (Energiesubstanzen, osmotischer Druck, Viskosität und alkalische Reaktion) bietet (VASTERLING, 19; SHETTLES, 33; BERGMANN, 34; ANTOINE,30; BELONOSCHKIN, 28,29); doch können auch hier pathologische Verhältnisse vorliegen. MILLER und KURZROCK (35) haben festgestellt, daß bei infiziertem Cervicalschleim eine Migration der Spermien in diesen nicht eintritt, da der pH-Wert nach der sauren Seite verschoben ist. Hinzukommen natürlich noch schädliche Einwirkungen seitens der Bakterien und deren Toxine (23,24,25). Aus diesen Überlegungen heraus untersuchte E. LANDES (31) 32 Patientinnen, die im konzeptionsfähigen Alter an derartigen Infekten litten:

Tabelle 10 (nach E. LANDES, 31)

pH des Cervikalschleimes	Zahl der Patientinnen
unter 5	ø
5-6	4
6-7	15
7-8	5
8-9	8
über 9	ø

4 dieser Patientinnen hatten im hinteren Scheidengewölbe (Cervixschleim) pH-Verhältnisse (pH 5-6), die eine Konzeption sehr unwahrscheinlich werden lassen: Der steile Abfall der Figuren 1-4 im pH-Bereich 6,2-5,4 demonstriert, daß hier die entscheidenden Veränderungen an den submikroskopischen Spermatozoonstrukturen vonstatten gehen. Daß diesen Veränderungen nicht nur rein lytische Vorgänge, sondern vielmehr auch biochemische Umwandlungen (Eiweißagglutination) zugrunde liegen, sei an Hand der bei pH 5,4 an den Schwänzen beobachteten Veränderungen gezeigt: Die von der Zentralfibrille zu den 9 Doppelfibrillen ziehenden speichenartigen Proteinfäden werden durch die Säure vermutlich in der Weise koagu-

liert, daß sie sich insgesamt verkürzen und die Ringfibrillen (2x9) nach der Mitte zu verlagern. Letztere agglutinieren untereinander und mit den dicken Längsfibrillen, die ebenfalls ihre ursprüngliche topographische Anordnung verlieren. Der Abstand zwischen diesen und den ganz außen liegenden circulären Spangen ist somit größer geworden (siehe Zeichnung b). Bei stärkeren Säuregraden setzt eine völlige Lysis der dünnen Fibrillen ein, wodurch es den intakten dicken Fibrillen wieder ermöglicht wird, weiter nach außen zu rücken (siehe Zeichnung c und Abbildung 16). Diese Darlegung resultiert aus der Auswertung von jeweils 500 Spermienschwänzen bei pH 6,2; 5,4; und 4,2. In diesem pH-Bereich sind Motilitätsverluste also nicht nur auf die Zerstörung der Mittelstücke (Mitochondrien), die zu 95-100% geschädigt sind, sondern womöglich auch auf jene Veränderungen am Fibrillensystem der Schwänze zu beziehen. Wenn man zudem bedenkt, daß bei pH 5,4 (3/4 Stunde Verweildauer in 0,3-molarer Milchsäure) fast alle Spermien ihre Vitalität eingebüßt haben (siehe Figur 4), kann man mit Berechtigung sagen, daß die besprochenen elektronenmikroskopischen Strukturveränderungen der einzelnen Spermienabschnitte durchaus definitive Hinweise auf die Motilität und Vitalität und damit zwangsläufig auf ihre Befruchtungskapazität geben.

Die Auflösung des Akrosoms, der Mitochondrien und des Filamentapparates bei stärkeren Säuregraden (pH 4,2 und 3,2) dürfte auf die lytische Wirkung der Milchsäure zurückzuführen sein (die dicken äußeren Längsfibrillen des Mittelstückes und des Schwanzes blieben unversehrt!). Überraschend resistent erwies sich die Kernsubstanz. Selbst bei pH 3,2 zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen. Dies ist dadurch zu erklären, daß der isoelektrische Punkt von Nucleinsäuren, Chromatin und Lecithin noch etwas niedriger liegt = pH 3,0 (BELONOSCHKIN, 28). Die Stabilität der Nucleoproteide des Kernes soll durch eine säureresistente Komponente gewährleistet sein, die nach POSALAKY als ein spezifisches Lipoid aufzufassen ist (J. MOLNAR, 26).

Bei pH 8,0 ergaben sich nur geringe Veränderungen. Dies ist ja verständlich, da Motilität und Vitalität bei pH 8,0 sehr gut sind (siehe Kurve 4). Da der pH-Wert des Cervikalschleimes nach Angabe der meisten Autoren (SEGNY und VIMEUX, 36; BELONOSCHKIN,

28; ANTOINE, 30) etwa 8,0 beträgt, können Analogien zwischen elektronenoptischer Struktur und bekannt guter Lebensfähigkeit der Samenfäden im Cervicalschleim festgestellt werden. Sicherlich liegen hier aber viel kompliziertere Verhältnisse vor, zumal die chemische Beschaffenheit des Cervicalschleimes in keiner Weise durch Alkalisieren mit NaOH zu imitieren ist. Die elektronenoptischen Ergebnisse im alkalischen Bereich sind somit nur schwerlich in ein Verhältnis zu den "in vivo" statthabenden Abläufen zu bringen. In diesem Sinne könnte auch die bei pH 9,0 festgestellte Veränderung der Köpfe und der Mittelstücke (nur 35% der Akrosome und 20-25% der Mittelstücke sind noch unversehrt) ausgelegt werden. Vermutlich ist die NaOH-Konzentration bei pH 9,0 für die Spermien derart unphysiologisch, daß ihre elektronenoptische Struktur in erwähnter Weise verändert wurde. Allerdings ist die Akrosommembran und die Doppelmembran der Mitochondrien meistens gut erhalten und der Filamentapparat niemals verändert. Dies spricht immerhin dafür, daß das alkalische Milieu für die menschlichen Samenfäden günstiger als das saure ist.

Am Schluß dieser Diskussion soll nochmals betont werden, daß die bei sauren pH-Verhältnissen beobachteten elektronenoptischen Strukturveränderungen der menschlichen Spermatozoen die eigentliche Ursache für deren verringerte bzw. aufgehobene Vitalität, Motilität und damit Befruchtungskapazität sind. Der Tatbestand, daß in den unteren Genitalabschnitten der Frau bisweilen zu saure pH-Werte vorliegen, die eine Sterilität bedingen können, sollte dazu veranlassen, einerseits diesen pathologischen pH-Verhältnissen große Bedeutung bezüglich der Sterilität beizumessen, andererseits diese Probleme in der modernen Fertilitäts- und Sterilitätsforschung keineswegs zu vernachlässigen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Das Untersuchungsmaterial umfaßte 35 Ejakulate von Patienten, die aus fertilitätsdiagnostischen Gründen in die Klinik kamen.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab folgende Ergebnisse:

1. Die Methacrylateinbettung war wesentlich besser geeignet als die Eponeinbettung, wie auch aus Vergleichen mit lichtmikroskopischen Befunden (Eosintest) hervorging.
2. Als der empfindlichste Teil des menschlichen Spermiums erwies sich das Mittelstück: Schon bei pH 5,8 waren die Mitochondrienleisten zu 80-85% grobkörnig aufgelöst oder verklumpt.
3. Im Kopfbereich spielten sich die Veränderungen hauptsächlich am Akrosom ab. Dieses entfernte sich mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration immer mehr vom Kern und wurde bei weiterer Senkung des pH schließlich völlig aufgelöst. Als sehr resistent erwies sich die Kernsubstanz.
4. Der Schwanzabschnitt war weniger von den Veränderungen betroffen. Abweichungen von der normalen Struktur zeigten sich erst bei pH 5,4.
5. Die Ergebnisse sind in den Figuren 1-4 zusammengefaßt, welche verdeutlichen, daß für das menschliche Spermatozoon das physiologische Milieu optimale Bedingungen darstellt und das alkalische Milieu im Wesentlichen nur geringe Auswirkungen hat, daß hingegen schon geringe Erhöhungen der Wasserstoffionenkonzentration auf Grund der beobachteten elektronenmikroskopischen Veränderungen und der festgestellten herabgesetzten Vitalität (Eosintest) die Befruchtungskapazität der Spermien herabsetzen bzw. aufheben müssen.
6. Es galt besonders den pH-Bereich 6,2-5,4 genau zu untersuchen, da in der Vagina und in der Cervix unter pathologischen Umständen derartige pH-Verhältnisse vorliegen können. Es konnte gezeigt werden, daß sich gerade in jenem pH-Bereich die entscheidenden Veränderungen an den submikroskopischen Spermatozoenstrukturen abspielen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. JOEL, Ch.A. — Studien am menschlichen Sperma. 2. vollst. neu bearb. und erw. Auflage. B. Schwabe & Co.-Verlag,Basel (1953)

2. SCHEURMANN, H. und DOEPFMER, R. — Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten. Ergänzungswerk: Band VI/3, Fertilitätsstörungen beim Manne. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1960)

3. BARGMANN, W. — Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. 4. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1962)

4. HORSTMANN, E. — Neue Ergebnisse der Andrologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1965)

5. ARNBERG, A. — The ultrastructure of the human spermatozoon. Acta obstet. gynec. scand. (Stockh.) 36, supply 2 (1957)

6. SCHULTZ-LARSEN, J. und HAMMEN, R. — The submicroscopic morphology of human spermatozoa. Dan.Med.Bull (Ugeskr.Larg. 1956 Nr. 31) 3, 141 - 150

7. SCHULTZ-LARSEN, J. — The morphology of the human sperm. Electron microscopic investigations of the ultrastructure. Act.path. microbiol. scand., Supply 128 (1958)

8. LANDES, E. und KAPESSER, W. — Elektronenoptische Untersuchungen über die Ultrastruktur des menschlichen Spermatozoenkerns. Hautarzt 9, 463 - 466 (1958)

9. LANDES, E. — Elektronenoptische Untersuchungen über menschliche Spermatozoen im ultradünnen Schnitt. Arch.klin.exp.Derm. 211, 149 - 150 (1960)

10. BAWA, S. R. — Fine structure of human sperm tail. Department of Anatomy, Cornell University Medical College New York, U.S.A. (1962)

11. NICANDER, L. — Development of the fibrous sheath of the mammalian sperm tail. Department of Anatomy and Histology Veterinärhögskolan, Stockholm 51 Sweden (1962)

12. HAMMEN, R., SCHULTZ-LARSEN, J. and CARLSEN, F. — Electronenmicroscopy of human spermatozoa. Fertility and Sterility 5, 411 - 420 (1952)

13. LORD ROTSCHILD — The human spermatozoon. Brit.Med.J. Nr. 5066, 301 (1958)

14. FRIEDLÄNDER, J. — Observations of human spermatozoa: An electron microscope inquiry. Proc. Roy. Soc. (cand) Ser. B, 140, 60 - 69 (1952)

15. ZABONI, L. and STEFANINI, M. — On the configuration of the plasma membrane of the mature spermatozoon. Fertility and Sterility 19, 570 - 579 (1968)

16. FAWCETT, D.W. Structure of the mammalian spermatozoa. Int.Rev.Cytol. 7, 206 (1958)

17. REIMER, L. Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967)

18. DOCUMENTA GEIGY Wissenschaftliche Tabellen. 6. Auflage (1960)

19. VASTERLING, H. W. Praktische Spermatologie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 51 - 52 (1960)

20. VASTERLING, H. W. Praktische Spermatologie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 44 (1960)

21. EMMENS, C. W. The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen - ion concentrations. J. Physiol. 106, 471 - 481 (1947)

22. SCHIRREN, C. Experimentelle Untersuchungen zur Schnelldifferenzierung menschlicher Spermatozoen mit Hilfe der Eosin-Färbung. Arch.klin.exp.Derm. 207, 63 (1958)

23. VASTERLING, H. W. Zur Frage der spermabiologischen Bedeutung der Cervix uteri. Arch. Gynäc. 189, 285 - 289 (1957)

24. BUXTON, C. L. Bacteriology of the cervix in human sterility. Fertility and Sterility 5, 493 (1954)

25. BUXTON, C. L. and WONG, ADA S. H. — Spermicidal bacteria in the cervix as a cause of sterility. Amer.J.Obstetr.64,628 - 636 (1952)

26. MOLNAR, J. — Morphologie der Samenzellen. Wiener klin. Wschr. 37, 685 (1968)

27. BODNAR, St. — Studies on the morphology and biology of human spermatozoa. Fertility and Sterility 12, 328 - 342 (1961)

28. BELONOSCHKIN, B. — Biologie und Klinik der Spermatozoen. Archiv für Gynäkologie 169, 169 - 174 (1939)

29. BELONOSCHKIN, B. — Spermatozoen im weiblichen Organismus. Münch. med. Wschr. 847 - 850 (1939)

30. ANTOINE, T. — Die Bedeutung des Cervixfaktors für die Sterilität. Archiv für Gynäkologie 189, 245 - 255 (1957)

31. LANDES, E. — Bedeutung des pH-Wertes für das Spermatozoon. Arch. klin. exp. Derm. 213, 736 - 740 (1961)

32. MEY, R. — Die Funktion der cervix uteri in ihrer Bedeutung für Fertilität und Sterilität. Ther.Umschau 19, 285 - 290 (1962)

33. SHETTLES, L. B. — Der Cervicalcyclus beim Menschen. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 12, 1 - 9 (1952)

4. BERGMANN, P. — Spermigration and cyclic changes in cervical mucus. Fertility and Sterility 4, 183 (1953)

5. MILLER, E. G. und KURZROCK, R. — Zit. nach E. Landes, Bedeutung des pH-Wertes für das menschliche Spermatozoon. Arch. exp.klin. Derm. 213, 736 - 737 (1961)

6. SEGNY, J. und VIMEUX, J. — Zit. nach B. Belonoschkin, Biologie und Klinik der Spermatozoen. Archiv für Gynäk. 169, 167 (1939)

Dem Referenten, Herrn

Priv.-Doz. Dr. med. F r i e d r i c h S c h r ö p l

sage ich herzlichen Dank für die Überlassung des Themas, für die vielen wertvollen Hinweise und sein stets vorhandenes Verständnis.

Dem Direktor der Klinik, Herrn

Prof. Dr. med. H e l m u t R ö c k l

danke ich ergebenst für die freundliche Übernahme des Korreferates und für die Möglichkeit, an seiner Klinik arbeiten zu dürfen.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Herrn Dr. S t r o u x für seine Hinweise bei der Bearbeitung des Themas und Fräulein S c h e n k für ihre stetige Hilfe bei der Ausführung des experimentellen Teiles der Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 20. Mai 1945 wurde ich als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Heinz Lurz und seiner Ehefrau Margarete Lurz, geb. Sponsel in Sesslach / Coburg geboren.

Von September 1951 bis Juli 1955 besuchte ich in Höchberg / Würzburg die Volksschule. Als Schüler des Humanistischen Gymnasiums in Würzburg bestand ich im Juli 1964 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich das Medizinstudium an der Universität Würzburg, an der ich im Oktober 1967 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Am 18. Dezember 1970 bestand ich das Staatsexamen in Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Karlheinz Lurz

Schnelldruck - Böhler, 87 Würzburg, Wirsbergstraße 10

Schnelldruck - Böhler, 87 Würzburg, Wirsbergstraße 10